

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 03-013391

(43)Date of publication of application : 22.01.1991

(51)Int.Cl.

B41M 5/40

(21)Application number : 01-148492

(71)Applicant : CANON INC

(22)Date of filing : 13.06.1989

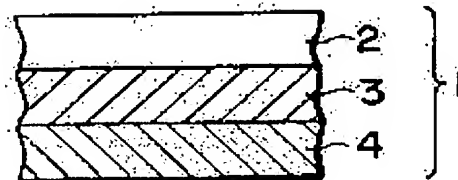
(72)Inventor : TOMA KOICHI  
KUSHIDA NAOKI  
ASAOKA MASANOBU

## (54) THERMAL TRANSFER MATERIAL

### (57)Abstract:

**PURPOSE:** To impart a high density transfer recording image having sharpness and free from missing transfer even to a material to be recorded low in surface smoothness and to make lift-off erasure possible by successively providing the first ink layer dividing printing at its interface or divided internally at the time of printing and the second layer having selective printing/correction function corresponding to temp. on a support.

**CONSTITUTION:** A thermal transfer material 1 is formed by successively providing the first ink layer 3 and the second ink layer 4 on a support 2. The second ink layer 4 has transfer properties substantially at 90° C and has no transfer properties substantially at 40° C. The first ink layer 3 is divided at the interface with the support 2 or divided internally at the time of printing due to heating and pref. has function making the second ink layer 4 easy to transfer to a material to be recorded. Therefore, the first ink layer 3 pref. has an ink composition low in flocculation force at the time of heating and becoming high in adhesion in a heat non-applied part or in a cooled state after the application of heat. The first ink layer 3 contains wax as the first component and a water-soluble resin is used especially pref. as the second component of said layer 3.



## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision  
of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's  
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

## ⑫ 公開特許公報(A) 平3-133391

⑤ Int. Cl.<sup>5</sup>  
C 12 P 21/06識別記号  
庁内整理番号  
8214-4B

④ 公開 平成3年(1991)6月6日

審査請求 未請求 請求項の数 1 (全4頁)

⑭ 発明の名称 ジペプチドの製造法

⑮ 特 願 平1-270114

⑯ 出 願 平1(1989)10月17日

⑰ 発 明 者 大 城 隆 東京都町田市旭町3-6-6

⑱ 発 明 者 上 島 孝 之 東京都町田市中町4-5-10

⑲ 出 願 人 協和醸酵工業株式会社 東京都千代田区大手町1丁目6番1号

## 明 細 書

## 1. 発明の名称

ジペプチドの製造法

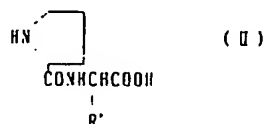
## 2. 特許請求の範囲

水性媒体中、プロリンイミノペプチダーゼ活性を有する酵素源の存在下、式(I)



(式中、Rは低級アルキル基またはアリール基を  
表わす)

で表わされるL-またはD-プロリンのエステル類とL-またはD-α-アミノ酸とを反応させ、該水性媒体中に、式(II)



(式中、R'はα-アミノ酸残基を表わす)  
で表わされる含プロリンジペプチドを生成させる

ことを特徴とするジペプチドの製造法。

## 3. 発明の詳細な説明

## 産業上の利用分野

本発明は、プロリン含有ペプチドの製造法に関する。L-プロリル-L-フェニルアラニン、L-プロリル-L-チロシンおよびL-プロリル-L-トリプトファンなどのプロリン含有ペプチドは、血圧降下剤の構成成分としての用途が期待される。

## 従来の技術

プロリン含有ペプチドの製造方法には、有機化学的方法と酵素的方法がある。

有機化学的方法におけるペプチド合成は、N末端、C末端および側鎖の保護、縮合、脱保護の3つの過程が要求され、工程が複雑になっている。また反応中に、酸処理、アルカリ処理および加熱処理を伴うためラセミ化が起こる可能性もある。

有機化学的方法において保護を必要としない方法として、例えばL-プロリンにホスゲンを作用させてL-プロリンのN-カルボキシアミノ酸無

水物としたものと、L-フェニルアラニンを含む  
 するホウ酸カリウム水溶液とをpH10.2で、0  
 ℃の温度で反応させる方法が知られている〔ジ  
 ーナル・オブ・オーガニック・ケミストリー  
 (Journal of Organic Chemistry) 32, 3415(1967)〕。

酵素的にプロリン含有ペプチドを合成する方法  
 として、例えば、N-カルボベンゾキシー-L-ア  
 ルギニンメチルエステルとL-プロリンアミドと  
 にクロストリバイン(酵素番号3.4.2.2.8)を作  
 用させてN-カルボベンゾキシー-L-アルギニン  
 -L-プロリンアミドを合成する方法が知られて  
 いる〔バイオテクノロジー・レターズ(Biotechnology  
 Letters) 8, 873 (1986)〕。

#### 発明が解決しようとする課題

有機化学的方法におけるペプチド合成で、保護  
 を必要としない方法は、N-カルボキシアミノ酸  
 無水物を合成する際、極めて毒性の高いホスゲン  
 を使うため、危険な合成法である。

また、酵素的な方法におけるペプチド合成で使  
 用されるクロストリバインは、嫌気性細菌であるク

ロストリジウム属由来のため調製が困難な点と、  
 両方の基質がいずれも保護アミノ酸で、しかも生  
 成物の脱保護も必要であるという点で実用的な方  
 法であるとは言い難い。

#### 課題を解決するための手段

本発明者らは、プロリン含有ペプチドの製造法  
 について、鋭意検討した結果、N末端がプロリン  
 であるペプチド鎖からN末端のプロリンを特異的  
 に除去できるプロリンイミノペプチダーゼ(酵素  
 番号3.4.11.5)の存在下プロリンのエステル類  
 とアミノ酸とを反応させた際に、基質であるプロ  
 リンのエステル類のイミノ基、またこれに作用す  
 るアミノ酸のカルボキシル基および側鎖の官能基  
 を保護する必要がなく縮合反応を行うことができ、  
 かつ反応条件が中性かつ常温常圧であることより  
 ラセミ化が起こる可能性が少ないプロリンアミ  
 ン酸で表わされるジペプチドが合成できることを見  
 出し、本発明を完成した。

すなわち、本発明は、水性媒体中、プロリンイ  
 ミノペプチダーゼ活性を有する酵素源の存在下式

(I)



(式中、Rは低級アルキル基またはアリール基を  
 表わす)

で表わされるL-またはD-プロリンのエステ  
 ル類とL-またはD-α-アミノ酸とを反応さ  
 せ、該水性媒体中に、式(II)



(式中、R'はα-アミノ酸残基を表わす)

で表わされる含プロリンジペプチドを生成させる  
 ことを特徴とするジペプチドの製造法を提供する。

式(I)のRの定義中、低級アルキル基として  
 は、炭素数1~8の直鎖または分岐状のアルキル、  
 例えばメチル、エチル、n-プロピル、イソプロ  
 ピル、n-ブチル、イソブチル、sec-ブチル、  
 tert-ブチル、n-ペンチル、イソペンチル、ネ

オペンチル、n-ヘキシル、n-ヘプチルおよび  
 n-オクチルなどの基があげられる。アリール基  
 としては、フェニル、ナフチルなどの基があげら  
 れる。

式(II)のR'の定義中、α-アミノ酸残基にい  
 うアミノ酸としては、いかなるアミノ酸も含まれ  
 る。

本発明に用いるプロリンイミノペプチダーゼ活  
 性を有する酵素源としては、ペプチド鎖のN末端  
 に存在するプロリンをそのペプチドから遊離させ  
 る触媒作用を有する限り、とくに制限されるもの  
 ではなく、該酵素の精製標品、同粗精製標品、該  
 酵素含有物、例えば該酵素活性を有する微生物の  
 菌体または菌体処理物などいずれも用いることが  
 できる。

例えば、バチルス・ブレビス(Bacillus brevis)  
 ATCC8185、バチルス・ブレビス(Bacillus brevis)  
 ATCC9999、バチルス・ブレビス(Bacillus brevis)  
 FERM P-5242(特公昭62-51591号公報)、ビフィド  
 バクテリウム・インファンテイス(Bifidobacterium

infantis)ATCC15697などの微生物が生産する酵素や高等動物の肝臓由来または植物由来の酵素などを用いることができる。

固体処理物としては、例えばアルギン酸などの担体に固定化したもの、凍結乾燥菌体、細胞膜を破壊して得られた粗抽出液、あるいはこの抽出液を上記と同様に固定化したもの、またこの粗抽出液を塩析、吸着クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィーなどの手段により精製したもの、さらにはこの精製標品を上記の様に固定化したものなどがあげられる。また、遺伝子のクローニングにより得られる高発現プラスミドを有する組換え株、あるいはその生産する高力価酵素を利用することはさらに好ましい。

本発明のプロリンのエステル類とアミノ酸との縮合反応は、水またはリン酸緩衝液またはトリス塩酸緩衝液などの緩衝液、あるいはメタノール、エタノール、ジメチルフォルムアミドなどを含有する水性媒体中で、pH7～10、好ましくはpH

8～9で、15～80℃、好ましくは25～60℃の温度で行う。プロリンのエステル類は反応液に対して、10～1000mM、好ましくは100～500mMの濃度で用いられる。各種アミノ酸は反応液に対して1～100mM、好ましくは5～50mMの濃度で用いられる。

プロリンイミノペプチダーゼは、抽出酵素を使う場合、0.05～3.0U/㎖、好ましくは0.2～2.0U/㎖加え、直接微生物菌体を使う場合には、0.1～10%（湿重量）菌体濃度で反応させる。ここで、プロリンイミノペプチダーゼの酵素活性は、30℃、50mMのトリス塩酸緩衝液（pH7.4）中で、1分間にプロリンパラニトロアニリドより1μmoleのプロリンを遊離させる力価を1単位（1U）として表わす。

縮合反応において、反応時間が長くなると生成物であるジペプチドの加水分解が起こるので好ましくない。従って、縮合反応終了と同時に反応液から菌体およびその処理物を除去するか、加熱処理（約100℃）などにより酵素を失活させて反

応を停止させ、生成したジペプチドの加水分解を極力抑えることが必要である。

L-プロリル-L-アミノ酸で表わされるジペプチドの合成反応が終了した時点で速やかに反応を停止させ、反応液より目的物質であるジペプチドと未反応基質であるプロリンメチルエステルおよびL-アミノ酸とをそれぞれ分離回収する。この分離回収は、公知の吸着クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、溶媒抽出、分別晶析などの方法で行うことができる。

以下に実施例を示す。

#### 実施例1

L-プロリンメチルエステル200mMとL-フェニルアラニン25mMを含むpH8.0の反応液に、プロリンイミノペプチダーゼを1.2U/㎖となるように添加し、全量を100㎖として30℃で振盪しながら反応を行った。40分間反応後、反応液を高速度液体クロマトグラフィー（HPLC）で分析したところプロリルフェニルアラニン18

mMの生成が認められた。この反応液を加熱処理（100℃、3分間）し、変性タンパクを遠心分離で除去した後、まずシリカゲルカラムクロマトグラフィーでプロリンメチルエステルを取り除き、ついで逆相HPLCを用いて目的物質プロリルフェニルアラニンとフェニルアラニンとを分離した。この結果、L-プロリル-L-フェニルアラニンを1.44mM得た。

#### 実施例2

L-フェニルアラニン25mMの代わりにD-L-フェニルアラニン25mMを用いる以外は実施例1と同様に行って、L-プロリル-L-フェニルアラニンを0.72mM得た。

#### 実施例3

L-フェニルアラニン25mMの代わりにL-チロシン25mMを用いる以外は実施例1と同様に行って、L-プロリル-L-チロシンを1.38mM得た。

#### 実施例4

L-フェニルアラニン25mMの代わりにL-ト

手続補正書(自発)

平成1年12月27日

33

特許庁長官殿

リプトファン25mMを用いる以外は実施例1と同様に行って、L-プロリン-L-トリプトファンを1.88mM得た。

実施例5

L-プロリンメチルエステル200mMの代わりにD-L-プロリンメチルエステル200mMを用いる以外は実施例1と同様に行って、L-プロリン-L-フェニルアラニンを0.68mM得た。

発明の効果

本発明により効率のよいプロリン含有ペプチドの酵素的製造法が提供される。

特許出願人 (102)協和醗酵工業株式会社

代表者 加藤幹夫



1. 事件の表示

平成1年特許願第270114号

2. 発明の名称

ジペプチドの製造法

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

郵便番号 100

住所 東京都千代田区大手町一丁目6番1号

名称 (102) 協和醗酵工業株式会社

(TEL: 03-282-0036)

代表者 加藤幹夫



4. 補正の対象

明細書の発明の詳細な説明の欄

5. 補正の内容

- (1) 明細書第10頁8行目の「1.44mM」を「1.44mmol」に訂正する。

特許庁  
1.12.28

方式  
審査

返  
答

- (2) 同書中、第10頁13行目の「0.72mM」を「0.72mmol」に訂正する。
- (3) 同書中、第10頁下から4行目の「1.38mM」を「1.38mmol」に訂正する。
- (4) 同書中、第11頁3行目の「1.88mM」を「1.88mmol」に訂正する。
- (5) 同書中、第11頁8行目の「0.68mM」を「0.68mmol」に訂正する。